

Sensor zum Nachweis von Proteinen und Verfahren zu dessen Herstellung

Patent number: DE19618812
Publication date: 1997-11-20
Inventor: WESSA THOMAS (DE); SIGRIST HANS (CH)
Applicant: KARLSRUHE FORSCHZENT (DE)
Classification:
- **international:** G01N33/68; G01N33/53
- **european:** C12Q1/00B2, G01N33/543K2B
Application number: DE19961018812 19960510
Priority number(s): DE19961018812 19960510

Also published as:

WO9743631 (A1)
EP0897536 (A1)

Abstract of DE19618812

The invention relates to a sensor for detecting proteins on the key-lock reaction principle, consisting of a sensor body, one surface of which is coated with a polymer layer, where the receptor molecules on the key-lock reaction are bonded to said polymer layer. It is the aim of the invention to design the sensor in such a way that it can be easily and highly reproducibly made. This is achieved in that the bond between the polymer and the receptor molecules is provided by a photoreactive molecule which is covalent to the lysine of a receptor molecule and inserted into a C-H bond of the polyimide.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

BEST AVAILABLE COPY

19 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

Patentschrift

DE 196 18 812 C 1

51 Int. Cl.⁶:
G 01 N 33/68
G 01 N 33/53

21 Aktenzeichen: 196 18 812.1-52
22 Anmeldetag: 10. 5. 96
43 Offenlegungstag: —
45 Veröffentlichungstag
der Patenterteilung: 20. 11. 97

Innerhalb von 3 Monaten nach Veröffentlichung der Erteilung kann Einspruch erhoben werden

73 Patentinhaber:

Forschungszentrum Karlsruhe GmbH, 76133
Karlsruhe, DE

72 Erfinder:

Wessa, Thomas, 67346 Speyer, DE; Sigrist, Hans,
Kleinenried, CH

56 Für die Beurteilung der Patentfähigkeit
in Betracht gezogene Druckschriften:

DE 44 18 926 C1
EP 3 61 729 A2

54 Sensor zum Nachweis von Proteinen und Verfahren zu dessen Herstellung

57 Die Erfindung betrifft einen Sensor zum Nachweis von Proteinen nach dem Prinzip der Schlüssel-Schloß Reaktion bestehend aus einem Sensorkörper, von dem eine Oberfläche mit einer Polymerschicht überzogen ist, wobei an die Polymerschicht die Rezeptormoleküle der Schlüssel-Schloß Reaktion gebunden sind.

Aufgabe der Erfindung ist es nun, den Sensor so auszugestalten, daß eine einfache Herstellung bei guter Reproduzierbarkeit gegeben ist.

Gelöst wird diese Aufgabe dadurch, daß die Bindung zwischen dem Polymer und den Rezeptormolekülen durch ein photoreaktives Molekül vermittelt wird, welches kovalent am Lysin eines Rezeptormoleküls gebunden ist und in eine C-H Bindung des Polyimids inseriert.

DE 196 18 812 C 1

DE 196 18 812 C 1

Beschreibung

Die Erfindung betrifft einen Sensor zum Nachweis von Proteinen nach dem Oberbegriff des Patentanspruchs 1, wie er aus der DE 44 18 926 bekannt ist und ein Verfahren zu dessen Herstellung.

Es gibt bislang einige etablierte analytische Verfahren um auch Biomoleküle zu analysieren, die sich aber meist aufwendiger und teurer Labormethoden bedienen (HPLC, GC-MS). Eine ähnlich preisgünstige Alternative zu der hier beschriebenen Methode stellen hingegen die sogenannten Immunoassays dar. Diese basieren ebenfalls auf der Bindung eines Analyten an einen Antikörper, benutzen aber zwangsläufig ein indirektes Verfahren für den Nachweis dieser Bindung. Dabei wird der Probe ein radioaktiv-, fluoreszenz- oder enzymmarkiertes analyt-analoges Molekül zugesetzt, das mit dem Analyt um die Antikörperbindestellen konkurriert. Zur Auswertung ist damit ein Verfahren nötig, das aus mehreren Reagenzienzuführungen, Inkubations- und Waschgängen besteht; die Gesamtzeit pro Assay beträgt typischerweise eine Stunde. Eine On-line-Messung ist damit ausgeschlossen.

Darüber hinaus wurden weitere Immunosensorprinzipien in der Literatur beschrieben. Nach Meinung vieler Autoren weichen sie immer noch stark von der Idealvorstellung eines preisgünstigen, genügend empfindlichen zukünftigen Immunosensors ab: In mehreren Übersichtsartikeln wurden solche Methoden bereits aufgrund ihrer hohen Kosten (Oberflächen-Plasmonen-Resonanz, Gitterkoppler, Differentielles Interferometer) bzw. wegen ihrer niedrigen Empfindlichkeit (Potentiometrischer Immunosensor) kritisiert, während der Immunosensor auf Oberflächenwellen (OFW)-Basis bislang favorisiert wurde.

Aus der EP 0 361 729 A2 ist ein Verfahren der e. g. Art zur Erzeugung eines Sensors bekannt, welcher eine Schutzschicht zur räumlichen Trennung von Substrat und wäßriger Analytlösung aufweist. Dieser Sensor weist bei einer Arbeitsfrequenz > 100 MHz Dämpfungen zwischen 30 und 40 dB auf, wodurch eine hohe Störanfälligkeit bei starkem Rauschen verursacht wird.

Der Nachteil des in der DE 44 18 926 beschriebenen Sensors besteht darin, daß die Herstellung einen hohen Arbeitsaufwand bei einem hohen Gefährdungspotential erfordert und daß die Sensoreigenschaften eine starke Streuung aufweisen.

Aufgabe der Erfindung ist es nun, einen Sensor der e. g. Art so auszugestalten, daß eine einfache Herstellung bei guter Reproduzierbarkeit gegeben ist.

Gelöst wird diese Aufgabe durch die Merkmale der Patentansprüche 1 und 3. Die Unteransprüche beschreiben vorteilhafte Ausgestaltungen des Verfahrens.

Der Sensor ermöglicht die spezifische Messung der Anwesenheit bzw. der Konzentration verschiedener Biomoleküle wie Proteine, Enzyme sowie komplexerer Makromoleküle — Teile des Erbgutes (DNS, RNS) oder verschiedene Krankheitserreger (z. B. Viren oder Bakterien) — durch Direktnachweis der Bindung an spezifische Antikörper in wäßrigen Lösungen. Mit dieser Methode sind damit keine zeitaufwendige Verfahren mehr notwendig, die auf die Konkurrenz zwischen gelabelten und ungelabelten Analyten beruhen (indirektes Nachweisverfahren bei Immunoassays).

Bei dem Sensor handelt es sich um einen massensensitiven Sensor, der die bei der Sorption des Analyten verursachten Schallgeschwindigkeitsänderung von akustischen Oberflächenwellen (OFW) nutzt, um auf die

sorbierte Masse des Analyten und somit auf dessen Anwesenheit bzw. Konzentration in der Lösung zurückzuschließen.

Um eine analytenspezifische Sorptionsreaktion zu erhalten, sind selektive Beschichtungen auf dem OFW-Substrat notwendig.

Besondere Flexibilität ist hierbei dann gewährleistet, wenn diese Beschichtungen aus immunochemisch aktiven Molekülen wie Antikörpern oder Antigenen bestehen. Bei dem erfindungsgemäßen Sensor handelt es sich also um einen echten Immunosensor der seine Daten in-situ ermittelt und damit eine echte On-line-Meßmethode für Bioanalytik ermöglicht.

Gegenüber der herkömmlichen Bioanalytik bietet der beschriebene Sensor eine Reihe von Vorteilen:

- Kostengünstig: 4 — 10 DM pro Stück
- Empfindlichkeit wie Bio-Assay
- auf beliebige Biosysteme übertragbar
- sehr gute Langzeitstabilität

Die Erfindung wird im folgenden anhand eines Beispiels mit Hilfe der Figuren näher erläutert.

Fig. 1 zeigt den Verlauf einer enzymatischen Glukosezersetzung auf einem Sensor und die

Fig. 2 zeigt den Verlauf von Immunoreaktionen für unterschiedliche Antikörperkonzentrationen.

Die Fig. 3 zeigt den TRIMID Gehalt des Rezeptorproteins und

die Fig. 4 dessen Enzymaktivität anhand von Absorptionsspektren.

Die Fig. 5 zeigt die Rezeptoranbindung an das Polymer Polyimid.

Der Sensor in unserem Beispiel arbeitet auf der Basis akustischer Oberflächenwellen. Ein solcher Sensor wird in der DE 43 19 215 beschrieben.

Der Sensorkörper wird auf einer Seite zunächst mit einem Polymer, in diesem Beispiel einem aromatischen Polyimid beschichtet. Die Beschichtung der Oberfläche des Sensorkörpers mit Polyimid erfolgt wie in der DE 44 18 926, S. 3, Zeilen 11 bis 55 beschrieben. Auf die polyimidisierte Sensoroberfläche werden anschließend 10 µl des geeignet verdünnten, modifizierten Rezeptormoleküls gegeben.

Wie in Fig. 5 zu erkennen ist, kommt es nur zur Immobilisation von photomarkierten Enzym auf der polyimidisierten Sensoroberfläche, wenn der Wassergehalt in der Proteinmatrix niedrig gehalten wird. Bei einem zu hohen Wassergehalt im Protein kommt es bei Belichtung zur Reaktion des Carbens mit Wasser, so daß die Insertierungsreaktion zwischen Polyimid und Protein in den Hintergrund gedrängt wird und die Anbindung an die Sensoroberfläche ausbleibt. Aus diesem Grund werden die Sensoren 20 — 40 min in einem Vakuumtrockenschrank bei Raumtemperatur und einem Druck < 10 mbar behandelt. Optimal ist eine 30 minütige Trocknung bei 1 mbar. Der daraus resultierende eingetrocknete Enzymfilm wurde anschließend mit einer Quecksilberdampfampe belichtet. Zur Erzeugung der Triplettcarbene ist eine Belichtung des Enzymfilms bei 348 nm und 0,7 mW/cm² für 30 min notwendig.

Zur Immobilisierung wurde mit TRIMID modifizierte Glucoseoxidase (T-Glucoseoxidase, T-GOD) mit einem Proteingehalt von 1,92 mg/ml verwendet. Der TRIMID-Gehalt betrug 6,5 mol TRIMID pro mol Glucoseoxidase.

Voruntersuchungen zeigten, daß die T-GOD-Lösung nicht unverdünnt auf dem Sensor abgeschieden werden

konnte. Bei einer zu hohen Proteinkonzentration kommt es zu hohen Eingangsdämpfungen und es kann keine akustische Welle beobachtet werden.

Als Ergebnis dieser Voruntersuchungen wurde die T-Glucoseoxidaselösung im Verhältnis 1:125 mit Phosphatpuffer (1:100) verdünnt, 10 µl dieser Lösung auf den Sensor gebracht und das Enzym, wie oben beschrieben, immobilisiert (vakuumbehandelt, belichtet).

Mittels eines enzymatischen Assays konnte die auf der Sensoroberfläche abgeschiedene Menge an Enzym spektroskopisch bestimmt werden.

Zur Durchführung der Enzymaktivitätsüberprüfung sind folgende Lösungen notwendig:

Lösung 1

53 mg 3,5-Dichlor-2-Hydroxy-Benzosulphonsäure werden in Wasser (bidest.) gelöst und mit 1 M NaOH auf pH=7 gebracht. Dann werden 3 mg Peroxidase (Meerrettich) zugegeben und auf 10 ml mit Wasser aufgefüllt.

Lösung 2

16,2 mg 4-Aminophenazon werden in 10 ml Wasser gelöst.

Lösung 3

1,4 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ und 700 mg NaH_2PO_4 sowie 37,2 mg EDTA werden in 100 ml Wasser gelöst.

Lösung 4

1,8-D-Glucose werden in 10 ml Wasser gelöst.

In eine Küvette werden dann

1,55 ml von Lösung 3

0,2 ml von Lösung 4

0,2 ml von Lösung 1

50 µl von Lösung 2

gegeben und nach guter Durchmischung (Vortex) der Hintergrund bei 520 nm vermessen. Anschließend gibt man 50 µl einer angemessen verdünnten GOD-Lösung hinzu und mißt die Absorptionsänderung bei 520 nm (Ausbildung eines roten Farbstoffs) innerhalb der ersten Minuten. Bei hohen Glucoseoxidasekonzentrationen genügen 2 Minuten, bei den auf dem Sensor abgeschiedenen Mengen an Antigen wurde 10–20 Minuten lang gemessen.

Der Extinktionskoeffizient des entstehenden Farbstoffs beträgt $13300 (\text{M cm})^{-1}$. Damit ist es möglich die spezifische Enzymaktivität der Glucoseoxidaselösung zu bestimmen. Diese wird in "units/mg" angegeben, wobei eine "unit" wie folgt definiert ist: Eine "unit" oxidiert 1 µmol -D-Glucose pro Minute bei pH=5,1 ($T=35^\circ\text{C}$).

Da zur Erzeugung von 1 mol des roten Farbstoffs 2 mol Wasserstoffperoxid (aus der Glucosespaltung) notwendig sind, entspricht die gemessene Zunahme des Chromophors 0,5 units pro Minute.

Die Zunahme der Absorption bei 520 nm ist exemplarisch für drei verschiedene Sensoren in Fig. 1 angegeben. Daraus ergibt sich ein Mittelwert der Steigungen von 0,0021 Absorptionseinheiten pro Minute. Ein Vergleich mit der Enzymaktivität der T-GOD-Stammlösung zeigt, daß diese Absorptionszunahme einer Proteinmasse auf dem gesamten Sensor von 18,5 ng entspricht.

Die Bestimmung der Sensorempfindlichkeit sowie der Nachweisgrenze für polyklonale Antikörper gegen Glucoseoxidase erfolgte durch Variation der Antikörpermengen im Analytstrom.

Dazu wurden die Sensoren mit T-Glucoseoxidase über die beschriebene photoinitierte Reaktion beschichtet und zunächst mit Rinderserumalbumin (4 mg/ml) gespült, um die unspezifischen Bindungsstellen zu

blockieren. Da die Sensoren im Durchfluß mit dem Protein beprobt wurden, zeigten sie unterschiedliche Abscheidungsgeschwindigkeiten, die dann aber alle zu einer (innerhalb eines Fehlerbereichs von 10%) Frequenzänderung von 35 kHz gelangten.

Die so vorbehandelten Sensoren wurden dann einzeln mit Antikörperlösung beprobt, wobei der Analyt — polyklonale Antikörper gegen Glucoseoxidase — im Kreislauf über die Sensoren geleitet wurde. Dabei wurden jeweils unterschiedliche Antikörpermengen in 5 ml Phosphatpuffer gelöst und über die Sensoren geleitet. Die Konzentrationsreihe, die in Auszügen in Fig. 2 dargestellt ist, beinhaltete einen Bereich von 2–200 µg/ml Antikörper (entspricht 10–1000 µg).

Es sind verschiedene Frequenzabnahmen sowie unterschiedliche Anfangsgeschwindigkeiten der Immunreaktionen zu erkennen.

Die Änderung der Resonanzfrequenz des Oszillators wurde gegen die Antikörpermengen im Analytstrom aufgetragen. Die Steigung der Gerade gibt die Sensorempfindlichkeit wieder, die zu 58,8 Hz/µg bestimmt wurde.

Um die Korrelation zwischen Antikörpermengen und Reaktionsgeschwindigkeit zu bestimmen, wurde für jede Messung die Anfangsgeschwindigkeit der Immunreaktion ermittelt. Aus den Meßpunkten innerhalb der ersten Minute nach Analytzugabe konnte durch lineare Regression die Frequenzabnahme pro Zeiteinheit berechnet werden. Die Korrelationskoeffizienten waren bei allen ausgewerteten Kurven deutlich größer als 0,98.

Die so ermittelten Anfangsgeschwindigkeiten korrelieren mit der zugegebenen Antikörpermengen. Es resultiert ein deutlich linearer Zusammenhang zwischen den beiden Größen ($r = 0,9822$). Die Steigung der Regressionsgerade beträgt 4,92 Hz/(µg).

Um die Nachweisgrenze für polyklonale Antikörper gegen Glucoseoxidase zu bestimmen, geht man wie folgt vor.

Die Empfindlichkeit beträgt 58,8 Hz/µg, der Achsenabschnitt wurde mit 27,1 kHz bestimmt. Mit diesen Werten kann unter Einbezug des dreifachen Rauschsignals der Sensoren (120 Hz), die Nachweisgrenze für polyklonale Antikörper gegen Glucoseoxidase zu 2 µg bzw. 13,6 pmol bestimmt. Da die jeweilige Antikörpermengen in 5 ml Phosphatpuffer eingewogen wurde, entspricht dieser Wert einer minimal detektierbaren Konzentration von 2,7 nmol/l.

Das beschriebene Beschichtungsverfahren kann auch auf andere Sensor- bzw. Meßprinzipien übertragen werden. Beispielsweise können die Sensorchips des optischen Gitterkopplers in gleicher Weise mit modifizierten Rezeptormolekülen beschichtet werden.

Als mögliche Rezeptormoleküle können Enzyme, Antigene und Antikörper sowie Nukleinsäuren verwendet werden.

Ein Beispiel für eine Beschichtung ist an dem Antigen Glucoseoxidase gezeigt, das direkt mit 3-Trifluoromethyl-3-(m-isothiocyanophenyl)-diazirin (TRIMID) umgesetzt wurde, um so zu einem photoreaktiven Protein zu gelangen. Den Antikörper selbst mit TRIMID zu modifizieren ist prinzipiell ebenso möglich, aber kostenintensiver.

Der Syntheseweg konnte nicht direkt von dem literaturbekannten T-BSA auf T-GOD übertragen werden, da Glucoseoxidase das Coenzym FAD enthält, das nicht kovalent an das Enzym gebunden ist. Durch die Umsetzung von GOD mit TRIMID bei pH 11,4 mittels Inkubation bei 50°C wurde Glucoseoxidase zwar mit TRIMID modifiziert, das Coenzym aber war abgetrennt, was

durch das UV-Spektrum nachgewiesen wurde. Es konnte eine Schulter bei 348 nm (TRIMID) festgestellt werden, die FAD-Peaks bei 375 bzw. 450 nm waren nicht mehr zu erkennen.

Untersuchungen haben gezeigt, daß die Inkubation bei 50°C zur Abtrennung des Coenzyms führt, die Behandlung des Enzyms bei pH=11.4 diese Dissoziation jedoch nicht herbeiführt.

T-GOD wurde deshalb nach folgender Vorschrift hergestellt:

18 mg Glucoseoxidase und 1.27 g -D-Glucose wurden in 0.1 Vol-% TEA (in Wasser, pH = 11.4) gelöst und die resultierende Lösung mit reinem TEA auf einen pH von 10.4 eingestellt.

Zugabe von 170 µl TRIMID (29 µmol/l) in Chloroform 30 sec im Ultraschallbad beschallen, wobei eine milchig gelbe Suspension entstand
2 Stunden bei 37°C im Wasserbad inkubieren
über eine Sephadex G-25-Säule in 1.5 mM NaCl, 0.05 mM Natriumphosphatpuffer (pH=7.4) chromatographieren.

Eine Bestimmung der Proteinkonzentration ist mit der Methode nach Lowry möglich. Dazu wurde ein speziell vorbereiteter BSA-Standard als Referenz vermessen und die Extinktionen des T-GOD darauf bezogen.

Für diese Untersuchung war eine Stammlösung aus 0.5 ml 2%iger CuSO₄-Lösung, 0.5 ml 2%-iger Tartratlösung und 49 ml 2%-iger Na₂CO₃-Lösung in 0.1 M NaOH notwendig. Um die Proteinkonzentration der Fraktionen 12 und 13 zu bestimmen, wurden 100 µl mit PBS (1:100) auf 1 ml verdünnt und 6 Proben hergestellt, indem jeweils 10 µl, 20 µl und 30 µl auf 200 µl mit PBS (1:100) verdünnt wurden (Doppelbestimmung). Zu diesen Proben kam je 1 ml der Stammlösung hinzu, das Gemisch wurde 10 min stehen gelassen.

Anschließend erfolgte die Zugabe von 100 µl 0.5 N Folinlösung, die ein Extinktionsmaximum bei 578 nm erzeugt, was nach 30 min vermessen werden konnte. Mit Hilfe des BSA-Standards konnte anschließend die Proteinmenge von T-GOD errechnet werden; es ergab sich eine Proteinmassenkonzentration von 4.22 mg/ml.

Der Trimidgehalt eines Proteins kann durch den Extinktionsunterschied einer Probe vor und nach dem Belichten bei 348 nm überprüft werden. Bei Glucoseoxidase stellt sich das Problem, daß die FAD-Moleküle in diesem Bereich ebenfalls Licht absorbieren, was den TRIMID-Peak überdeckt. Bei der Bestimmung des TRIMID-Anteils in T-GOD wurde die Tatsache ausgenutzt, daß das FAD nach einer Inkubation bei erhöhter Temperatur vom Enzym abgetrennt wird. Da der FAD-Peak die Absorptionsbande von TRIMID überlagert, wurde zur Detektion von TRIMID zunächst das FAD abgetrennt, indem das Protein (jeweils 500 µl) 2 h bei 50°C inkubiert und anschließend die Lösung über eine PD10-Säule chromatographiert wurde. In der Enzymfraktion war danach nur noch der Proteinpeak bei 280 nm erkennbar.

Die Proteinfraktion wurde dann in der Küvette 2mal je 10 min belichtet und nach jeder Belichtung ein Absorptionsspektrum aufgenommen. Man erkennt in Fig. 3 deutlich eine Veränderung der Absorption zwischen 340 nm und 400 nm, also im Bereich der TRIMID-Bande.

Der Gehalt an kovalent gebundenem TRIMID betrug 8 ± 2 mol TRI-MID pro mol Glucoseoxidase.

Die enzymatische Aktivität des modifizierten Proteins konnte spektroskopisch mittels des oben beschriebenen enzymatischen Assays ermittelt werden. Dazu wur-

den 50 µl T-GOD, die 8.73 µg Protein enthielten untersucht.

Mit dieser Methode wurde die enzymatische Aktivität der verwendeten Glucoseoxidaselösungen bestimmt. In Fig. 4 ist die Kinetik der enzymatischen Katalyse der Stammlösung (GOD) sowie die des modifizierten Enzyms (T-GOD) dargestellt.

Durch den linearen Teil der Kurve wurde mittels linearer Regression jeweils eine Gerade bestimmt. Diese diente als Kalibriergerade zur Detektion der enzymatischen Aktivität der jeweiligen Glucoseoxidase auf dem Sensor.

Die Bestimmung der Absorptionszunahme mittels linearer Regression ergab für T-GOD einen Wert von 0.989 min^{-1} . Mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes kann daraus die spezifische Enzymaktivität der modifizierten Glucoseoxidase mit 34.92 units/mg bestimmt werden. Im Vergleich dazu besitzt die nicht modifizierte Glucoseoxidase einen Wert von 87.59 units/mg.

Um die Anbindung von T-GOD auf einer Oberfläche und im speziellen an Polyimid zu beobachten, wurde das erzeugte T-GOD mit [¹⁴C] markiert. Dazu wurde die Glucoseoxidase zunächst reduktiv methyliert und anschließend auf einer polyimidisierten Oberfläche immobilisiert.

Bei der reduktiven Methylierung werden Aminofunktionen mit Formaldehyd umgesetzt und die entstehenden Schiff'schen Basen reduziert. Diese hochspezifische Reaktion greift nur die -Aminogruppen der Lysineinheiten im Protein sowie den N-Terminus in der Aminosäuresequenz an. Um eine Denaturierung durch Zerstörung der Disulfidbrücken sowie die sofortige Reduktion des Formaldehyds zu vermeiden, wird als mildes Reduktionsmittel Natriumcyanborhydrid verwendet, was zu N,N-Dimethylderivaten führt. Es resultiert eine nahezu vollständige Umsetzung bei Einsatz des sechsfachen Überschusses an Formaldehyd, bezogen auf die Proteinmasse.

Da die reduktive Methylierung in HEPES-Puffer (pH=7.5) abläuft, wurde 1 ml T-GOD (4.22 mg/ml) über einer PD10-Säule ungepuffert und die Proteinfraktion zur radioaktiven Markierung verwendet. Dabei wurde wie folgt vorgegangen:

800 µl dieser Proteinfraktion wurden in ein lichtgeschütztes Reaktionsgefäß gebracht (Schutz der TRIMID-Gruppe) Zugabe von 6.5 µl [¹⁴C]-Formaldehyd (= 200 nmol), mit einer Radioaktivität von 11.6 µCi Zugabe von 100 µl NaCNBH₃ (= 240 mmol/l) auffüllen mit HEPES-Puffer auf 1 ml 3 h rühren bei Raumtemperatur das Produkt wurde über einer PD10-Säule chromatographiert, um überschüssiges Formaldehyd abzutrennen.

Die T-GOD-Fraktion des radioaktiv markierten Enzyms wurde wie oben beschrieben auf den Proteingehalt untersucht. Es ergab sich eine Proteinkonzentration von 0.915 mg/ml.

Um den Grad der radioaktiven Modifizierung von T-GOD zu bestimmen, wurden jeweils 5 µl der einzelnen Fraktionen der [¹⁴C]-T-GOD-Synthese mit 5 ml Szintillationslösung (eine Mischung aus 1080 ml Toluol p.a., 5.4 g 2,5-Diphenyloxazol (PPO), 0.2 g 2,2'-p-Phenylbis-5-Phenyloxazol (POPOP), 920 ml Triton und 40 ml Eisessig) vermischt (Vortex) und die -Strahlung mit einem Szintillationszähler bestimmt.

In der Proteinfraktion wurde eine Aktivität von 2793 dpm (dpm = decompositions per minute) gefunden. Die Korrelation dieser Werte mit den Ergebnissen der Proteinbestimmung nach Lowry des radioaktiv markierten

Proteins ergab 597 dpm/ μ g Protein.

Die enzymatische Aktivität der radioaktiv markierten Proteinfraction wurde wiederum mittels des enzymatischen Assays bestimmt. Dazu wurden 20 μ l der Proteinfraction mit HEPES auf 200 μ l verdünnt und von 50 μ l dieser Lösung (= 4.6 μ g) die enzymatische Aktivität bestimmt.

Die Auswertung ergab eine Absorptionszunahme von 0.27 min^{-1} , was einer spezifischen Enzymaktivität von 18.19 units/mg entspricht. Das bedeutet, daß selbst nach zwei Modifikationen des Proteins die enzymatische Aktivität noch vorhanden ist.

Um die Ankopplung des Proteins an eine polyimidisierte Oberfläche zu beobachten, wurden Deckplättchen aus Glas polyimidisiert, anschließend mit [^{14}C]-T-GOD beschichtet und die Radioaktivität gemessen. Die Polyimidisierung von hydrophilen Oberflächen ist neben anderen Methoden eine wichtige Grundlage für Immobilisationen auf akustoelektrischen Bauelementen.

Auf die polyimidisierten Glasplättchen wurden 30–50 μ l des radioaktiv markierten Enzyms aufgebracht, nach einer definierten Einwirkzeit belichtet und anschließend gewaschen. Als Kontrollexperiment wurden analog behandelte, jedoch unbelichtete Plättchen mitgeführt.

Die Waschprozedur bestand aus fünfmaligem Spülen der Plättchen mit einer Lösung aus 50 mM PBS, 150 mM NaCl sowie 0.02 Vol-% TWEEN 20. Zur Bestimmung der Radioaktivität wurden die Abdeckplättchen in die Szintillationsröhren gebracht, mit 5 ml Szintillationslösung bedeckt und nach kurzem Mischen (Vortex) die -Strahlung der polyimidisierten Glasträger bestimmt. In Fig. 5 ist zu erkennen, daß die Belichtung nach 30 min Einwirken keine Anbindung an das Polyimid bewirkt. Die Strahlung dieser Glasplättchen liegt etwa in der gleichen Größenordnung wie die der unbelichteten Kontrollproben. Erst nach wesentlich längeren Einwirkzeiten vor der Belichtung bzw. partielle Trocknung durch Anlegen eines Vakuums, was einen völlig eingetrockneten Proteinfilm zur Folge hatte, kommt es zur kovalenten Anbindung des Proteins an das Polyimid, was durch die deutlich höhere Radioaktivität der entsprechenden Glasträger zu erkennen ist.

Eine Photoimmobilisation von T-GOD auf Polyimid ist folglich möglich, sofern nur wenig Wasser in der Proteinmatrix vorhanden ist. Bei Anwesenheit von Wasser ist der Modifizierungsgrad von T-GOD mit TRIMID zu gering, so daß alle durch Belichtung erzeugten Carbene mit Wasser abreagieren und es zu keiner meßbaren Anbindung an die Oberfläche kommt. Weiterhin zeigen diese Untersuchungen, daß die gewählte Waschprozedur geeignet ist, unspezifisch anhaftende Proteinmoleküle von der polyimidisierten Oberfläche zu entfernen sowie Restradioaktivität auszuwaschen.

Patentansprüche

1. Sensor zum Nachweis von Proteinen nach dem Prinzip der Schlüssel-Schloß Reaktion bestehend aus einem Sensorkörper, von dem eine Oberfläche mit einer Polymerschicht überzogen ist, wobei an die Polymerschicht die Rezeptormoleküle der Schlüssel-Schloß Reaktion gebunden sind, dadurch gekennzeichnet, daß die Bindung zwischen dem Polymer und den Rezeptormolekülen durch ein photoreaktives Molekül vermittelt wird, welches kovalent am Rezeptormolekül gebunden ist und in eine C-H-Bindung des Polymers inseriert, wobei

das photoreaktive Molekül 3-Trifluoromethyl-3-(m-isothiocyanophenyl)-diazirin (TRIMID) ist.

2. Verfahren zum Beschichten von Sensoren gemäß Anspruch 1 mit Proteinen, wobei die Oberfläche des Sensors modifiziert wird und wobei auf der Sensoroberfläche eine silanhaltige Promoterschicht aufgebracht und daran eine Polymerschicht angebunden wird, gekennzeichnet durch folgende Verfahrensschritte:

- a) modifizieren der Proteine durch Anbinden von carbenerzeugenden Molekülen an die Ly-sineinheiten der Aminosäuresequenzen der Proteine, wobei die carbenerzeugenden Moleküle TRIMID sind,
- b) aufbringen der modifizierten Proteine auf die Polymerschicht,
- c) partielle Trocknung dieser Schicht und
- d) kovalente Anbindung der modifizierten Proteine an die Polymerschicht durch Einwirkung von UV-Licht.

3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß der Trocknungsgrad der Schicht durch anlegen von Vakuum erreicht wird.

Hierzu 3 Seite(n) Zeichnungen

Fig. 1 *

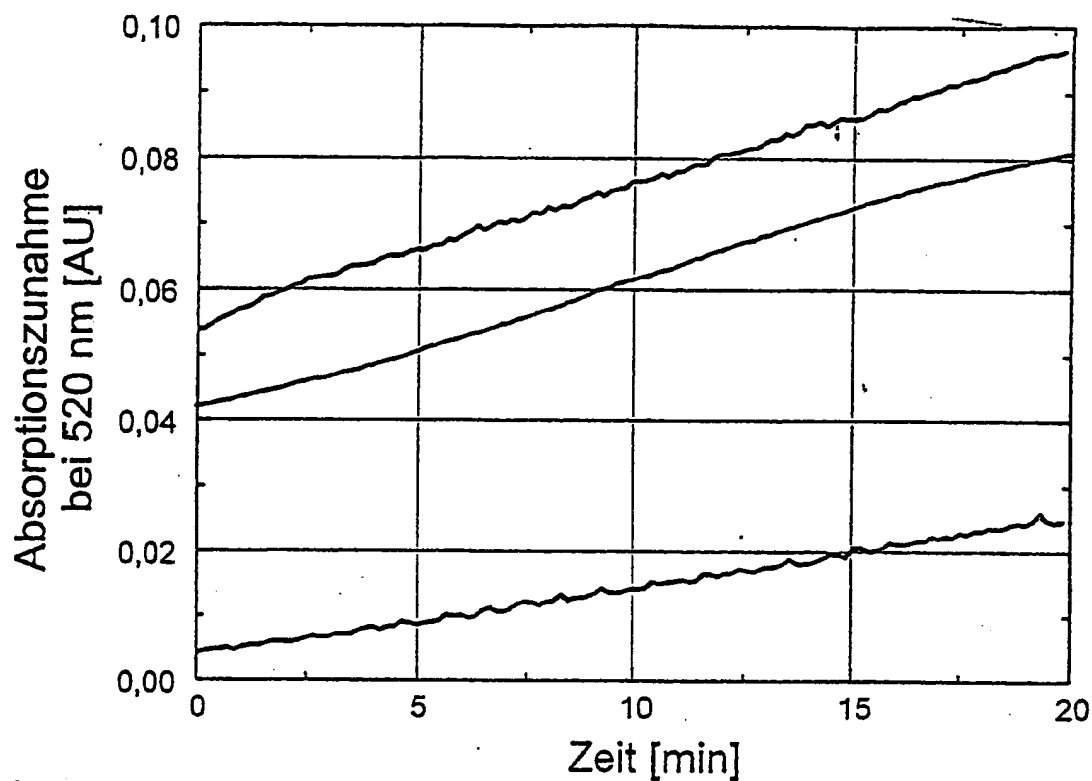


Fig. 2

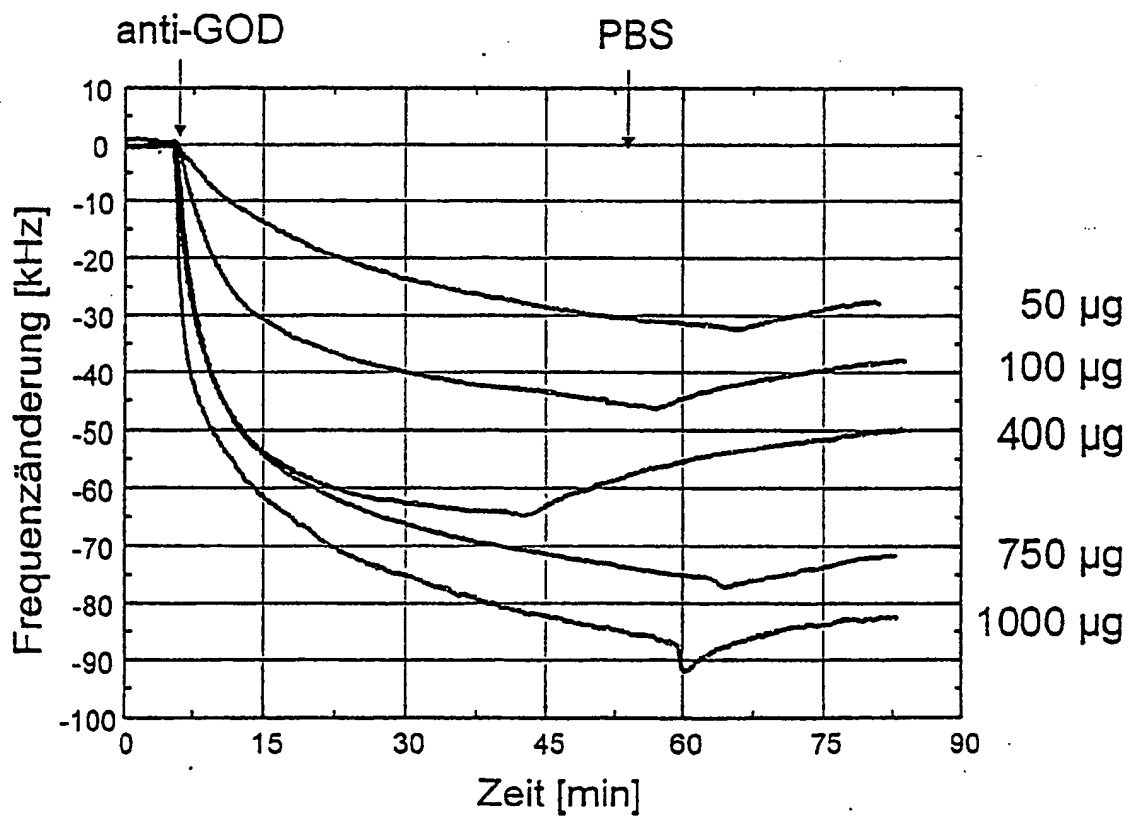


Fig. 3

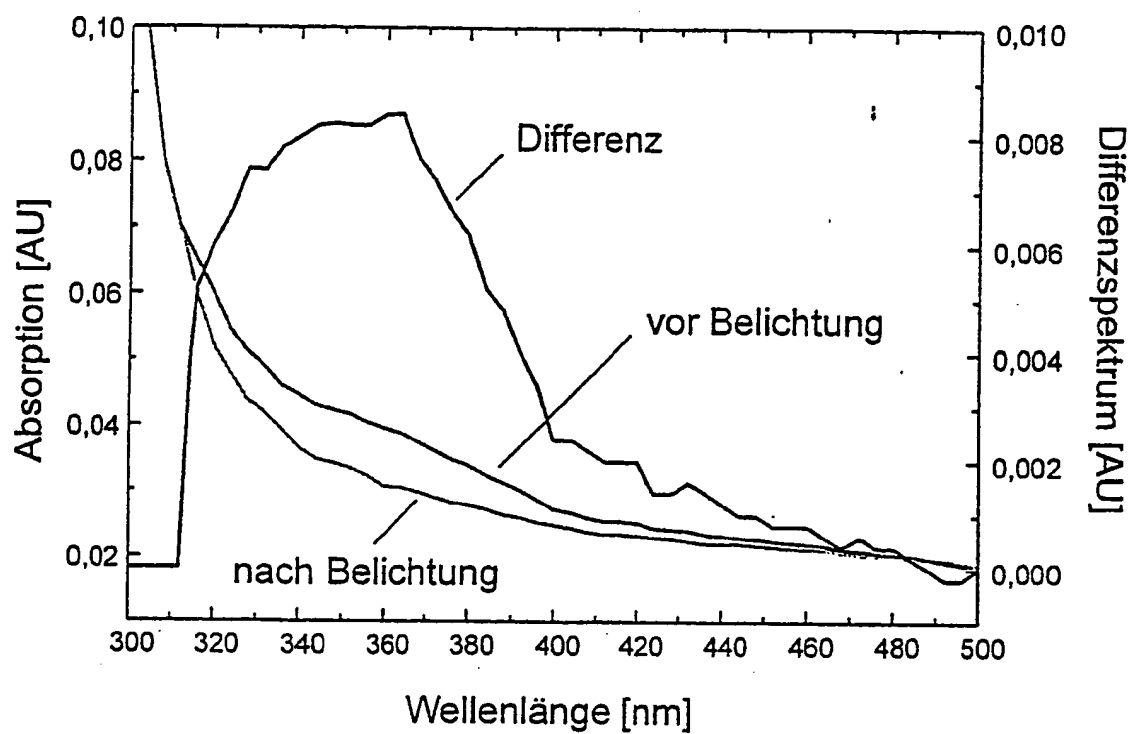


Fig. 4

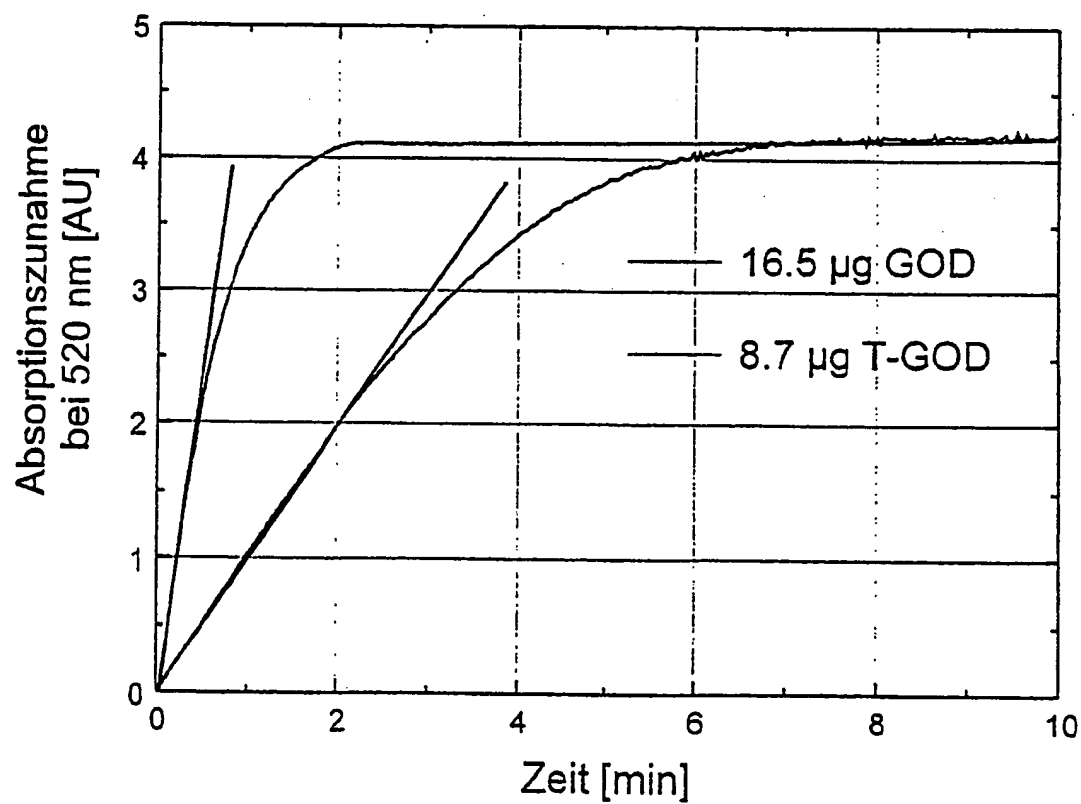
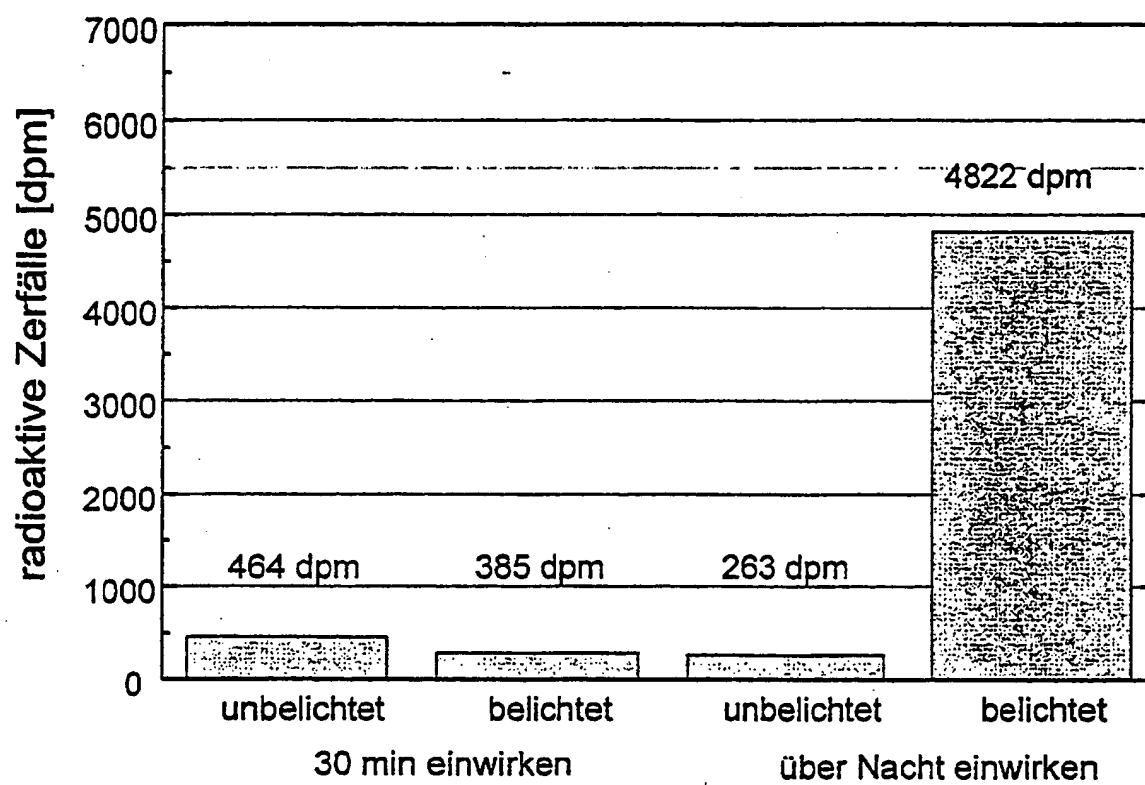


Fig. 5



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.